



Insulin-like growth factor- I increases p21
expression and attenuates cisplatin-induced acute
renal injury in rats

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 安田, 日出夫 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1263

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 4 1 0 号	学位授与年月日	平成 1 6 年 3 月 9 日
氏 名	安 田 日出夫		
論文題目	<p>Insulin-like growth factor-I increases p21 expression and attenuates cisplatin-induced acute renal injury in rats (Insulin-like growth factor-I は p21 の発現を増加しラットでのシスプラチン誘発急性腎障害を軽減する)</p>		

論文題目

Insulin-like growth factor-I increases p21 expression and attenuates cisplatin-induced acute renal injury in rats

(Insulin-like growth factor-I は p21 の発現を増加しラットでのシスプラチン誘発急性腎障害を軽減する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

シスプラチン誘発急性腎不全に細胞周期が関連し、特にサイクリン依存性キナーゼの一つで G1/S 期を調節している p21 の尿細管細胞における発現の亢進は腎障害に対して保護的な役割を果たすことが示唆されてきた。また、成長因子の一つである Insulin-like growth factor-I (IGF-I) は、培養筋細胞の p21 の発現を亢進することが報告されているが、シスプラチン誘発急性腎不全に対する効果の報告はない。本研究では、シスプラチン誘発急性腎不全に対するリコンビナントヒューマン IGF-I (rhIGF-I) の効果を調べるとともに、rhIGF-I の細胞周期調節機構に対する影響を検討した。

[材料ならびに方法]

雄性 SD ラットにシスプラチン 5mg/kg を陰茎静脈より静注し、その前日から rhIGF-I 150 μ g を 1 日 1 回連日腹腔内投与する (CDDP plus rhIGF-I) 群と同容量の生食を腹腔内投与する (CDDP alone) 群、及びシスプラチンの代わりに同用量の生食を静注し rhIGF-I を連日腹腔内投与するコントロール (rhIGF-I alone) 群 という 3 群に分けて、シスプラチン静注後 1, 3, 5 日目に、BrdU 40mg/kg 腹腔内投与 1 時間後に血清を採取するとともに屠殺し、腎臓を摘出、一部を 4% パラホルムアルデヒドで固定し、残りの腎臓は mRNA を抽出するまで凍結保存した。

血清尿素窒素、クレアチニン：自動酵素分析器で測定。

腎組織障害：PAS 染色で腎髄質外層外帯における障害の程度を 0~4 の 5 段階評価で 400 倍 20 視野 100 尿細管に対しスコア化し、半定量を行った。

腎尿細管アポトーシス：タネル染色陽性細胞及び PAS 染色におけるアポトーシス小体や核の凝集などで特徴づけられるアポトーシス細胞を 400 倍 20 視野で 腎髄質外層外帯の尿細管細胞あたりの比率で半定量した。

BrdU の取り込み：腎髄質外層外帯の尿細管に対して、BrdU 陽性細胞を 400 倍 20 視野でカウントし半定量した。

免疫染色：p21, p53, サイクリン D1, PCNA の免疫染色を施行し、腎髄質外層外帯の尿細管における各染色の陽性細胞を 400 倍 20 視野でカウントし半定量した。

リアルタイム PCR：1 及び 3 日目の腎臓より mRNA を抽出し逆転写後、p21 及び内部標準として GAPDH をリアルタイム PCR 法で検討した。

[結果]

(CDDP plus rhIGF-I) 群は (CDDP alone) 群に比べ、5 日目で血清クレアチニン、尿素窒素とも有意に減少し (0.92 ± 0.11 vs. 1.50 ± 0.15 mg/dl, $p < 0.05$, 53.40 ± 3.581 vs. $76.77 \pm$

3.756 mg/dl, $p < 0.05$)、さらに尿細管障害及び尿細管上皮細胞におけるアポトーシスの比率も軽減した($p < 0.05$)。また、3日目において(CDDP plus rhIGF-I)群は(CDDP alone)群に比べ p21 陽性細胞数と PCNA 陽性細胞数が増加し(5.15 ± 0.19 vs. $3.45 \pm 0.42/x400$ HPF, $p < 0.05$, 28.61 ± 1.89 vs. $18.26 \pm 2.14/x400$ HPF, $p < 0.05$)、サイクリン D1 陽性細胞数は低下した(3.30 ± 0.30 vs. $6.35 \pm 0.54/x400$ HPF, $p < 0.05$)。一方で BrdU の取り込み及び p21 の mRNA の発現には、有意差は見られなかった。

[考察]

本研究で、我々は rhIGF-I によってシスプラチン誘発急性腎障害が軽減することを示した。さらに、rhIGF-I はシスプラチンによる尿細管障害早期の段階で、G1/S 期での細胞周期の停止を誘導する p21 及び増殖と DNA 修復のマーカである PCNA の腎内の発現を増加させると共に、G1 サイクリンであるサイクリン D1 の発現を抑制した。S 期のマーカである BrdU の取り込みには影響を与えなかったことから、PCNA の発現の増加は DNA の修復の促進であることが示唆された。このことから、rhIGF-I は、シスプラチンによる腎尿細管障害に対して、p21 の発現を増強することによって、細胞周期を G1/S 期に停止させ DNA 修復を促進することが示唆された。

[結論]

rhIGF-1 はシスプラチン傷害後の腎内尿細管上皮細胞において p21 と PCNA を増加し DNA 修復を促進することによって腎障害を軽減させる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

[はじめに]

シスプラチン誘発急性腎不全に細胞周期が関連し、特にサイクリン依存性キナーゼの一つで G1/S 期を調節している p21 の尿細管細胞における発現の亢進は腎障害に対して保護的な役割を果たすことが示唆されてきた。また、成長因子の一つである Insulin-like growth factor-I (IGF-I) は、培養筋細胞の p21 の発現を亢進することが報告されているが、シスプラチン誘発急性腎不全に対する効果の報告はない。本研究では、シスプラチン誘発急性腎不全に対するリコンビナントヒューマン IGF-I (rhIGF-I) の効果を調べるとともに、rhIGF-I の細胞周期調節機構に対する影響を検討した。

[材料ならびに方法]

雄性 SD ラットにシスプラチン 5mg/kg を陰茎静脈より静注し、その前日から rhIGF-I 150 μ g を 1 日 1 回連日腹腔内投与する (CDDP plus rhIGF-I) 群と同容量の生食を腹腔内投与する (CDDP alone) 群、及びシスプラチンの代わりに同用量の生食を静注し rhIGF-I を連日腹腔内投与するコントロール (rhIGF-I alone) 群 という 3 群に分けて、シスプラチン静注後 1, 3, 5 日目に、BrdU 40mg/kg 腹腔内投与 1 時間後に血清を採取するとともに屠殺し、腎臓を摘出、一部を 4% パラホルムアルデヒドで固定し、残りの腎臓は mRNA を抽出するまで凍結保存した。

血清尿素窒素、クレアチニン測定：自動酵素分析器で測定。

腎組織障害：障害のみられた部位は腎髄質外層外帯に限定されていたので、PAS 染色で同部位を観察し、400 倍 20 視野 100 尿細管に対し、0~4 の 5 段階評価で障害の程度をスコ

ア化し、半定量を行った。

腎尿細管アポトーシス：タネル染色陽性細胞及びアポトーシス小体や核の凝集などで特徴づけられるアポトーシス細胞を尿細管細胞において 400 倍 20 視野で観察し、細胞の比率を用いて半定量した。

BrdU の取り込み：腎髄質外層外帯の尿細管における BrdU 陽性細胞を 400 倍 20 視野でカウントし半定量した。

免疫染色：腎髄質外層外帯の尿細管において、p21,p53,サイクリン D1,PCNA の免疫染色を施行し、陽性細胞を 400 倍 20 視野でカウントし、半定量した。

リアルタイム PCR：1 及び 3 日目の腎臓より mRNA を抽出し逆転写後、p21 及び内部標準として GAPDH をリアルタイム PCR 法で検討した。

[結果]

(CDDP plus rhIGF-I)群は(CDDP alone)群に比べ、5 日目で血清クレアチニン、尿素窒素とも有意に減少し(0.92 ± 0.11 vs. 1.50 ± 0.15 mg/dl, $p < 0.05$, 53.40 ± 3.581 vs. 76.77 ± 3.756 mg/dl, $p < 0.05$)、さらに尿細管障害及び尿細管上皮細胞におけるアポトーシスの比率も軽減した($p < 0.05$)。また、3 日目において(CDDP plus rhIGF-I)群は(CDDP alone)群に比べ p21 陽性細胞数と PCNA 陽性細胞数が増加し(5.15 ± 0.19 vs. $3.45 \pm 0.42/x400$ HPF, $p < 0.05$, 28.61 ± 1.89 vs. $18.26 \pm 2.14/x400$ HPF, $p < 0.05$)、サイクリン D1 陽性細胞数は低下した(3.30 ± 0.30 vs. $6.35 \pm 0.54/x400$ HPF, $p < 0.05$)。一方で BrdU の取り込み及び p21 の mRNA の発現には、差は見られなかった。

以上の結果から、申請者は、rhIGF-I がラットにおけるシスプラチンによる腎尿細管障害に対して p21 の発現を増強して細胞周期を G1/S 期に停止させ DNA 修復を促進させることにより、シスプラチン誘発急性腎障害を軽減させることを示した。临床上、種々の進行癌に頻用されているシスプラチンによる腎障害を予防する機構を示し、今後の臨床応用に展望を開くとともに、他の機序で生じた腎障害に対する治療の一助となることも期待される有益な研究であると考えられた。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) シスプラチン誘発ラット急性腎不全の発生メカニズムと障害部位について
- 2) 免疫染色の抗原の賦活化など具体的な実験方法について
- 3) IGF-I の腎臓に対する作用について
- 4) p53,p21,サイクリン D1 変動の解釈について
- 5) p21 の蛋白とメッセージの発現量の差について
- 6) 今回の研究結果に基づく臨床応用ならびに今後の展望について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分に理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 大 園 誠一郎

副査 峯 田 周 幸 副査 三 浦 克 敏